动 物 学 研 究 2004, Apr. 25 (2): 147～152
Zoological Research
CN 53－1040/Q ISSN 0254－5853

急纤虫营养细胞和休眠细胞的中间纤维－核骨架体系

李艺松，隋淑光，张 莉，顾福康*
（华东师范大学 生命科学学院，上海 200062）

摘要：利用生化分级抽提、DGD包埋－去包埋透射电镜术和SDS-PAGE凝胶电泳，研究了膜状急纤虫营养细胞和休眠细胞内中间纤维－核骨架体系的分化特征及其蛋白组成。观察到营养细胞中，位于细胞质不同区域的中间纤维形成网状，其网络的密度不同；核骨架中，核纤层位于细胞核周缘，薄层状，厚约50 nm；核内骨架由较致密的纤维网络组成。休眠细胞内该结构体系依然存在，但位于细胞内不同层次的纤维网比营养细胞的同种结构要致密得多，这可能与纤毛虫脱分化时细胞大范围的收缩有关；休眠细胞的包囊壁中层壁存在相当于中间纤维的网络结构。SDS-PAGE电泳图谱显示，休眠细胞内该体系的蛋白组成发生了较明显的变化，其中保留了营养细胞的部分蛋白条带，丢失了部分条带，同时还产生了一些特异性条带。分析表明，膜状急纤虫的中间纤维－核骨架体系是细胞在营养条件下和休眠状态下都稳定存在的结构；而纤毛虫形成休眠细胞后中间纤维－核骨架体系及蛋白组成上的变化提示，细胞在休眠状态下，基因的表达水平与营养细胞是不同的。

关键词：膜状急纤虫；营养细胞；休眠细胞；中间纤维－核骨架体系
中图分类号：Q959.116 **文献标识码**：A **文章编号**：0254－5853(2004)02－0147－06

Intermediate Filament-Nuclear Matrix System of Vegetative- and Resting-Cell of *Tachysoma pellionella* (Ciliophora, Protozoa)

LI Yi-song, SUI Shu-guang, ZHANG Li, GU Fu-kang*
(*Department of Biology, East China Normal University, Shanghai* 200062, *China*)

Abstract: Biochemical characters and protein compositions of intermediate filament (IF) -nuclear matrix (NM) system of vegetative- and resting-cell of *Tachysoma pellionella* were studied by the method of serial selective extraction, diethylene glycol distearate (DGD) embedment and emebedment-free electron microscopy, and SDS-PAGE. The result shows that in the vegetative cell, the IF, with diverse density in different regions, occurs in the cytoplasm; 50 nm thick and thin-layer-shaped lamina, in the periphery of nucleus; the NM is composed of a more densely arranged filament network. The same kind of network also exists in the resting cell, as well as in the middle-level layer of cyst wall, but presents more compact compared with the similar structure of vegetative cell, and this phenomenon may refer to the comprehensive contraction in the course of encystment. The result of SDS-PAGE shows that protein composition of this system has changed notably when the cyst is formed, of which, part of the proteins have been preserved and part lost, and some new and distinct proteins occur. The following conclusions can be obtained: the IF-NM system is a stable structure in both vegetative- and resting-cell; changes of IF-NM system and protein composition after encystment reveal that gene expression of resting cell is different from that of vegetative cell.

Key words: *Tachysoma pellionella*; Vegetative cell; Resting cell; Intermediate-type filament-nuclear matrix

在低等单细胞真核生物的中间纤维－核骨架体系的研究中，自从在大变形虫（*Amoeba proteus*）中观察到核纤层（Flickinger, 1974）后，又相继在金黄滴虫（*Ochromonas danica*）(Zhu & Chen, 1986)、

收稿日期：2003－09－22；接受日期：2003－12－25
基金项目：国家自然科学基金资助项目（30270160）；高等学校博士学科点专项科研基金资助
*通讯作者（Corresponding author），Tel：021－62232715，E-mail：fkgu@bio.ecnu.edu.cn

嗜热四膜虫（*Tetrahymena thermophila*）（Chen et al, 1994）和小眼虫（*Euglena gracilis*）（Feng et al, 1999；Wen, 2001）等中证实了这类结构的存在，加之发现源真核生物（Archezoa）的核骨架明显具有早期进化阶段的特征（Wen & Li, 1998）等情况，目前已对该结构体系在真核生物中存在的普遍性及其对细胞生命活动的重要性有了新的认识，但是对所述结构体系的组成及其功能仍知之不多。作者所在实验室在对纤毛虫冠突伪尾柱虫（*Pseudourostyla cristata*）的研究中观察到，细胞形成包囊后，部分微管类骨架经历了退化瓦解、仅少数毛基体和微管保留下来、而中间纤维类结构却没有变化的过程，这一结果揭示，与微管结构比较，中间纤维结构体系在不同生理状态的细胞中都是稳定存在的；不过我们对不同生理状态下该结构体系的变化细节仍不甚了解（Yang et al, 2001；Gu et al, 2002）。本文在以前工作的基础上，对形成毛基体吸收型包囊的膜状急纤虫（*Tachysoma pellionella*）的研究显示，其营养细胞中存在中间纤维－核纤层－核骨架体系，但其骨架组成成分则发生了变化，所得结果对分析中间纤维类结构的可能功能及其细胞在休眠状态下的生命活动特征是有意义的。

1 材料和方法

1.1 材 料

膜状急纤虫于1999年9月采自华东师范大学丽娃河内，样品依据Kahl（1935）的资料鉴定，并经分离和培养建立纯系。

将纤毛虫接种至加入麦粒的培养液中，置于20 ℃的恒温培养箱中培养。每两天补充少许新鲜培养液，使纤毛虫达到较高密度和处于良好的营养生长状态。

在虫体达到较高密度后进行人工诱导纤毛虫形成休眠细胞的实验，此时不再更换培养液，并中断食物供给，几天后大部分急纤虫便形成休眠细胞。

1.2 方 法

1.2.1 中间纤维－核骨架体系的提取 参考Fey et al（1984, 1986）的方法，在作较大改进的基础上，提取纤毛虫的营养细胞和休眠细胞的中间纤维－核骨架体系。具体步骤如下：将收集好的细胞用0.1 mol/L的PBS缓冲液漂洗3次，加入含相应浓度Triton X-100的CSK液（10 mmol/L PIPES, pH 6.8；100 mmol/L KCl；300 mmol/L sucrose；3 mmol/L $MgCl_2$；1 mmol/L EGTA；1.2 mmol/L PMSF；0.5% Trion X-100）处理3～5 min。600 *g*离心3 min，弃上清，PBS缓冲液漂洗，离心，RSB-magik液（42.5 mmol/L Tris-HCl, pH 8.3；8.5 mmol/L NaCl；1.6 mmol/L $MgCl_2$；1.2 mmol/L PMSF；1% Tween-40；0.5%脱氧胆酸钠）悬浮沉淀物，600 *g*离心3 min，PBS缓冲液漂洗，离心。沉淀物经含DNase Ⅰ（购自Worthington公司）的DB液（10 mmol/L PIPES, pH 6.8；100 mmol/L NaCl；300 mmol/L sucrose；3 mmol/L $MgCl_2$；1 mmol/L EGTA；1.2 mmol/L PMSF）于室温下消化20～30 min（DNase Ⅰ的含量为250 μg/mL），然后加硫酸铵至终浓度0.25 mol/L，1 000 *g*离心，PBS缓冲液漂洗，1 000 *g*离心，所得的沉淀物即为细胞的核骨架与中间纤维结构体系的样品。

1.2.2 透射电镜样品的制备 将样品用2%戊二醛在4 ℃下固定30 min，然后用CSK液漂洗；经1%的锇酸固定30 min，然后再经CSK液漂洗；梯度酒精脱水，正丁醇过渡，包埋。加入DGD（diethylene glycol distearate）于60 ℃下聚合24 h，超薄切片，将切片放入正丁醇中溶去DGD，梯度酒精脱水，醋酸异戊酯置换，CO_2临界点干燥，在透射电镜下观察。

1.2.3 骨架蛋白电泳的方法 将细胞进行选择性抽提，得到中间纤维－核骨架蛋白沉淀，加入等体积1×SDS凝胶加样缓冲液，置于沸水浴中加热3 min，经8 000 r/min离心后，收集上清液进行SDS-PAGE凝胶电泳，分析骨架蛋白的组成成分。

2 结 果

2.1 中间纤维－核骨架体系

2.1.1 营养细胞 在相当于原细胞质的区域，由中间纤维构成纤维网络。在网络的周缘，相当于细胞表膜下表质层位置，具一个包绕内周缘的纤维层，构成此网络纤维的直径约10 nm，有时由数根纤维聚拢在一起，构成直径30 nm左右的纤维束。网络表现出显著的不均一性，有的区域纤维相对密集，有的区域网格稀疏，形成一些较大的空间（图1）。纤维上常附有一些高嗜锇性的颗粒。除了与微管体系、核膜、细胞质膜相联系以外，中间纤维体系在细胞质中形成的三维网状结构还和细胞质的其他组分（如类似细胞器、脂质体、食物泡和拟糖原大小的颗粒）交织在一起（图2）。



图 1～7　膜状急纤虫的类中间纤维－核骨架体系

Figs. 1－7　Intermediate filament-nuclear matrix system in *Tachysoma pellionella*

BR：空白区（Blank area）；CW：包囊壁（Cyst wall）；CWFN：包囊壁中的纤维网（Filament network of cyst wall）；EC：外层壁（Exterior cystwall）；EFN：表质层纤维网（Filament network of epiplasm）；IF：胞质中间纤维（Intermediate filament）；LA：核纤层（Lamina）；

NMFN：核骨架纤维网（Nuclear matrix filament network）；NU：核仁（Nucleolus）；OOI：胞器或胞器内含物（Organelle or organelle inclusion）。
1～3．营养细胞（Vegetative cell）
1．表膜下皮层细胞质中间纤维，箭头示位于细胞周缘的纤维层（Intermediate filament beneath the pellicle，and arrow indicating fiber layer on the verge of cell）×25 000
2．中间纤维网中被镶嵌和锚定的胞器或胞器内含物，箭头示纤维束（Organelle or its inclusion beset and fixed in intermediate filament network，and arrow indicating fasciculi）×25 000
3．胞质中间纤维、核纤层和核骨架（Intermediate filament-nuclear matrix of cytoplasm）×40 000
4～7．休眠细胞（Resting cell）
4．包囊壁中纤维网的局部放大（Partial enlargement for filament network of cyst wall）×30 000
5．位于细胞表质层中的纤维网（Filament network of cell epiplasm）×30 000
6．胞质中间纤维、核纤层和核骨架网络，箭头示核纤层（Intermediate filament-clear matrix of cytoplasm，and arrow indicating lamina）×18 000
7．核纤层结构，箭头示核纤层（Structure of lamina，and arrow indicating lamina）×23 000

在细胞核位置，核纤层－核骨架体系形成密集的纤维网，其中：在核内周缘，核纤层纤维紧密排列成薄层状，电子着色程度比中间纤维及核骨架蛋白网络深；在细胞质面，由核纤层发出许多纤维或纤维束与中间纤维相连接；在核的内面，核纤层的纤维与核骨架纤维相联系，整个核纤层厚度约 50 nm；细胞核内为直径约 10 nm 的核骨架纤维网络，整个网络内的纤维明显要比由中间纤维构成的细胞质网络区域密集，网络内纤维的分布不均匀，有的区域较为密集，有的区域较为疏松，在靠近核纤层的区域，纤维的密集程度明显高于核内其他区域（图3）。

2.1.2 休眠细胞　在相当于包囊壁的位置，仍具有完整的电子致密结构，其中在中间层观察到一均匀细密的网络结构，与细胞质中的中间纤维网络相似（图4）。

在包囊壁下靠近表膜的位置，由成束的纤维构成一个致密的纤维带，整个胞质区同样存在一个纤维网络体系，构成网络的纤维直径 10 nm 左右，部分网络分布不均匀，有的区域密集，还有的区域呈圆形或椭圆形的空白区，空白区大小相当于一个细胞器所占的空间（图5）。

核纤层－核骨架体系与中间纤维网络相接续，其中：核纤层的厚度约在 50 nm 左右，由排列均匀、致密的单根或成束的纤维构成，向内与核骨架纤维相联系，向外与细胞质中的纤维相联系，从而把中间纤维、核纤层、核骨架维系为一个整体（图6）。核骨架纤维网的基本形态与细胞质中的网络基本一致，纤维以单根或成束存在，并与附近的纤维相联系，在核骨架网络中有电子密度很高的区域，形状近似圆形，此结构可能是核仁骨架区域，可观察到从核仁区的周围发出许多纤维，围绕着核仁呈放射状分布，在核仁的周围又与邻近的纤维交织在一起。形成一种稳定结构（图6，7）。

2.2 中间纤维－核骨架体系的蛋白组成

对抽提所得的营养期细胞和休眠细胞中的中间纤维－核骨架体系的骨架蛋白成分进行分析，其中营养期细胞的骨架蛋白集中在 17～71 kD，休眠细胞的骨架蛋白集中在 15～71 kD。两者共享的条带为 17、20、23、29、35、39、42、45、66、71 kD，营养期细胞所特有的蛋白条带为 22、26、31、38、48、55、60 kD；休眠期细胞所特有的条带为15、25、

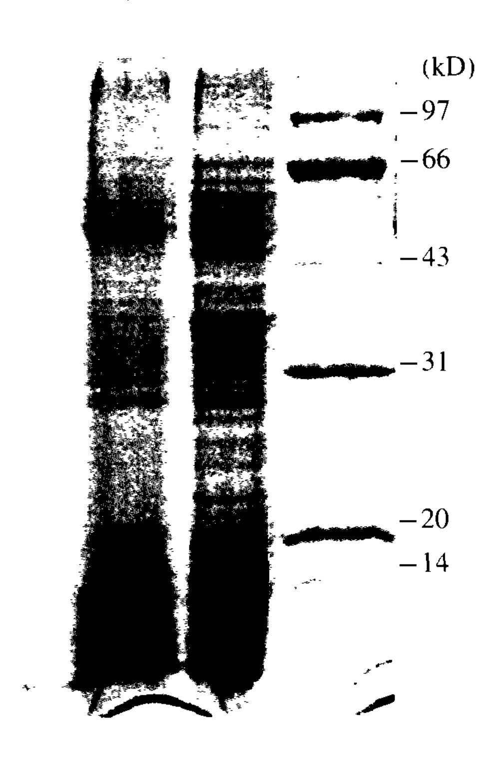


图8　膜状急纤虫中间纤维－核骨架体系蛋白组成的 SDS-PAGE 分析
Fig.8　Protein composition of intermediate filament-nuclear matrix in *Tachysoma pellionella*
图中自左往右依次为营养细胞、休眠细胞和分子量蛋白标准
（From left to right：vegetative cell，resting cell and marker）.

表 1　膜状急纤虫中间纤维－核骨架蛋白组成

Table 1　Protein composition of intermediate filament-nuclear matrix in *Tachysoma pellionella*

蛋白组分 Protein composition（kD）	相对百分含量 Relative content（%）	
	营养细胞 Vegetative cell	休眠细胞 Resting cell
15	—	10.05
17	8.65	8.98
20	3.51	4.26
22	3.71	—
23	3.76	3.61
25	—	3.08
26	3.57	—
27	—	3.80
29	7.72	5.10
31	5.61	—
33	—	5.11
35	9.34	6.28
38	5.55	—
39	5.42	11.07
42	3.79	4.07
45	5.11	3.65
48	5.05	—
51	—	5.50
54	—	7.73
55	9.14	—
57	—	6.42
60	7.23	—
62	—	5.56
66	5.71	2.88
71	7.14	2.83

27、33、51、54、57、62 kD，在休眠细胞中，共享蛋白多肽的蛋白含量占休眠细胞总骨架蛋白含量的 47.6%。在营养期细胞中，最为显著的蛋白条带为 35、55 和 17 kD，分别占骨架蛋白总含量的 9.34%、9.14%和 8.65%；在休眠细胞中，最为显著的蛋白条带为 39、15、17 和 54 kD，分别占骨架蛋白总含量的 11.07%、10.05%、8.98%和 7.73%（图 8，表 1）。

3　讨　论

3.1　中间纤维－核骨架体系的可能功能

以前的研究证明，纤毛虫的包囊壁是由细胞内制造的物质，通过分泌的形式输送到细胞外形成的胞质衍生物（Gutierrez et al，1983）。本文在急纤虫中观察到，休眠细胞的包囊壁中间层存在相当于中间纤维的网络结构，这在以往未报道过。纤毛虫在形成包囊的过程中，以微管为基本形态单元的细胞骨架结构或全部瓦解，或处于非功能状态及退化状态（Gu & Zhang，1992），但细胞内保留了中间纤维－核纤层－核骨架体系，与营养细胞相比，无论是构成此体系的基本形态单元还是纤维网的结构形态及组织方式，均无明显差异，这一结果表明：在纤毛虫中，中间纤维－核骨架体系是较微管结构更为稳定的细胞骨架体系。

电镜观察结果显示，中间纤维与细胞器、脂质体、食物泡、拟糖原颗粒等紧密相连，并发出细密的纤维将上述结构牢牢的镶嵌和锚定在其中，由此可以推测中间纤维与大多数膜系结构相附着，与细胞器间存在着普遍联系，同时与微管、微丝骨架体系也有密切连接。在组织上，中间纤维体系所构成的三维网架系统把细胞核、细胞质、细胞膜、细胞器维系在一起；在功能上，它为细胞通讯、核内外信号的传递提供了一个结构基础。

3.2 蛋白组成的变化

电泳结果显示，急纤虫在形成包囊后，细胞保留了部分营养细胞中的蛋白条带（即与营养期细胞共享的条带），又丢失了部分条带，同时还产生了一些特异性条带。该结果表明急纤虫在形成毛基体吸收型包囊的过程中，蛋白组成发生了明显的变化。

根据电泳分析结果，在急纤虫营养细胞及其休眠细胞中，在含量上占显著优势的蛋白多肽并不明显。营养细胞中较为显著的带为 17、35 和 55 kD，而休眠细胞中为 39、15、17 和 54 kD，这些蛋白多肽反映了两者在中间纤维 - 核骨架体系的蛋白组成上的差异。有研究表明，中间纤维 - 核骨架体系不仅在维持细胞形态方面具有作用，还参与了染色体的功能构建、DNA 复制及基因的表达和调控，这种调控和核骨架的蛋白组成有关，有一些骨架结合蛋白结合到核骨架上，调节基因的表达（de la Luna et al，1999; Nili et al，2001）。因此，营养细胞和休眠细胞的中间纤维 - 核骨架体系蛋白组成上的差异揭示，急纤虫在休眠状态下基因的表达水平与营养期细胞是不同的。

参考文献：

Chen B, Cai ST, Zhai ZH. 1994. Investigation of nuclear lamina in *Tetrahymena thermophila* [J]. *Acta Biologiae Experimentalis Sinica*, **27** (2): 153 - 158. [陈 彬，蔡树涛，翟中和. 1994. 四膜虫（*Tetrahymena thermophila*）核纤层的研究. 实验生物学报，**27** (2): 153 - 158.]

de la Luna S, Allen KE, Mason SL. 1999. Integration of a growth-suppressing BTB/POZ domain protein with the DP component of the E2F transcription factor [J]. *EMBO. J.*, **18**: 212 - 228.

Feng L, Gao CM, Li YZ. 1999. Like intermediate filament system in *Euglena gracilis* [J]. *Acta Scientiarum Naturalium, Universitatis Pekinensis*, **35** (4): 503 - 507. [冯 磊，高崇明，李荫蓁. 1999. 眼虫中存在中间纤维骨架体系. 北京大学学报（自然科学版），**35** (4): 503 - 507.]

Fey EG, Wan KM, Penman S. 1984. Eoithelial cytoskeletal framework and nuclear matrix-intermediate filament scaffold: Three-dimensional organization and protein composition [J]. *J. Cell Biol.*, **98**: 1983 - 1984.

Fey EG, Krochmalnic G, Penman S. 1986. The nonchromation substructures of the nucleus: The ribonnucleoprotein (RNP) -containing and RNP-deleted matrices analyzed by sequential fractionation and resinless section electron microscopy [J]. *J. Cell Biol.*, **102** (5): 1654 - 1665.

Flickinger CJ. 1974. The fine structure of four "species" of *Amoeba* [J]. *J. Protozool.*, **21**: 59 - 68.

Gu FK, Zhang ZR. 1992. Study on encystment and excystment of ciliate [J]. *Chinese Journal of Zoology*, **27** (5): 48 - 53. [顾福康，张作人. 1992. 纤毛虫形成包囊和脱包囊的研究及其意义. 动物学杂志，**27** (5): 48 - 53.]

Gu FK, Ni B, Yang ZY, Du BJ. 2002. Ultrastructure of the vegetative cell and resting cell in *Pseudourostyla cristata* (Ciliophora, Hypotrichida) [J]. *Acta Zool. Sin.*, **48** (2): 251 - 257. [顾福康，倪 兵，杨振云，杜宝剑. 2002. 冠突伪尾柱虫营养期和形成包囊期间细胞的超微结构. 动物学报，**48** (2): 251 - 257.]

Gutierrez JC, Torrez A, Perez-Silva J. 1983. Structure of the cyst wall precursors and kinetics of their appearance during the encystment of *Laurentiella acuminate* (Hypotrichida, Oxytrichidae) [J]. *J. Protozool.*, **30**: 226 - 233.

Kahl A. 1935. Urtiere oder Protozoa: I. Wimpetiere order Ciliata (Infusoria) [A]. In: Dahl F. Die Tierwelt Deutschlands [M]. Jena: G. Fischer. 604 - 606.

Nili E, Gady S, Cojocaru KY. 2001. Nuclear membrane protein LAP2β mediates transcriptional repression alone and together with its binding partner GCL (germ-cell-less) [J]. *J. Cell Sci.*, **114**: 3297 - 3307.

Wen JF, Li JY. 1998. The most original eukaryote-nuclear matrix of Archezoa [J]. *Science in China*, **28** (5): 423 - 430. [文建凡，李靖炎. 1998. 最原始的真核生物——源真核生物的核骨架. 中国科学，**28** (5): 423 - 430.]

Wen JF. 2001. Nuclear matrix and nuclear lamina of *Euglena gracilis* [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, **25** (6): 551 - 557. [文建凡. 2001. 小眼虫的核骨架研究. 水生生物学报，**25** (6): 551 - 557.]

Yang ZY, Gu FK, Ni B. 2001. Intermediate type filament-lamina-nuclear matrix of vegetative cell and resting cell in *Pseudourostyla cristata* [J]. *Zool. Res.*, **22** (1): 85 - 87. [杨振云，顾福康，倪 兵. 2001. 营养期和休眠期冠突伪尾柱虫的类中间纤维 - 核纤层 - 核骨架体系. 动物学研究，**22** (1): 85 - 87.]

Zhu H, Chen YZ. 1986. Microfilament-framework in the nucleus of *Ochromonas danica* [J]. *Acta Zool. Sin.*, **32**: 48 - 52. [朱桦，陈阅增. 1986. 金黄滴虫细胞核微丝系统的初步研究. 动物学报，**32**: 48 - 52.]